

## BAB 2

### MERISTEM

Diawali dari pembelahan sel pada zigot, tumbuhan berpembuluh menghasilkan sel-sel baru sampai akhirnya membentuk organ untuk menyusun tubuh tumbuhan. Pembelahan sel terjadi pada seluruh bagian tubuh tumbuhan selama masa perkembangan embrio, namun saat memasuki masa dewasa, pembentukan sel-sel baru hanya terbatas pada bagian-bagian tertentu dari tubuh tumbuhan. Bagian yang sel-selnya tetap mempertahankan sifat embrioniknya, sehingga terus membelah dikenal dengan meristem.

#### A. Karakter dan Klasifikasi Meristem

Klasifikasi meristem berdasarkan lokasinya pada tubuh tumbuhan dibedakan atas **meristem apikal** yang terdapat di ujung batang dan ujung akar, **meristem interkalar** yang terdapat di antara jaringan dewasa, seperti pada pangkal ruas batang rumput-rumputan, dan **meristem lateral** yang terdapat sejajar dengan keliling organ tempat jaringan itu berada, misalnya kambium pembuluh dan kambium gabus. Menurut asalnya, meristem dibedakan atas **meristem primer** dan **meristem sekunder**. Meristem primer adalah meristem yang berkembang langsung dari embrio, jadi merupakan kesinambungan kegiatan embrio. Meristem sekunder adalah meristem yang berkembang dari jaringan yang telah mengalami diferensiasi. Contohnya adalah kambium gabus atau felogen yang berkembang dari sel parenkim atau kolenkim yang telah mengalami diferensiasi. Klasifikasi menurut asalnya ini seringkali tidak dapat diterapkan, seperti pada akar adventif, yang berkembang dari jaringan yang telah dewasa, sehingga seharusnya merupakan meristem sekunder, tetapi struktur dan fungsinya adalah meristem primer.

Ciri sitologi meristem, mempunyai dinding sel tipis, jumlah protoplasma yang lebih banyak, nukleus relatif besar, vakuola kecil-kecil dan bentuknya lebih isodiametris dibandingkan sel jaringan dewasa. Biasanya protoplasma tidak mengandung cadangan makanan dan kristal, sedangkan plastida masih dalam stadium proplastida. Belum terbentuk ruang antar sel pada meristem. Pada sel-sel meristem dijumpai sedikit retikulum endoplasma (RE) dan mitokondrianya hanya memiliki sedikit kristae. Dijumpai golgi aparatus dan mikrotubul sebagai ciri terjadinya perkembangan dinding sel. Vakuola dalam selnya kecil dan menyebar di semua bagian sel.

Sel-sel pada lapisan yang lebih dalam pada shoot apical meristem (SAM) memiliki vakuola yang lebih banyak dan juga mengandung pati (Steeves et al., 1969). Pada beberapa takson, terutama paku-pakuan, konifer dan Ginkgo, sel-sel yang sangat bervakuolasi dijumpai pada posisi yang lebih keatas pada kubah meristem di SAM, sel-sel meristem pada embrio banyak mengandung timbunan pati.

Sel-sel meristem juga ditandai dengan adanya ukuran sel yang besar. Tetapi rasio ukuran sel dengan ukuran inti sel, yang dikenal sebagai rasio sitonuklear sangat bervariasi. Namun sebagian besar sel-sel meristem memiliki ukuran inti yang lebih kecil dibandingkan dengan proporsi ukuran sel.

Perkembangan meristem melalui berbagai tahap diferensiasi. Menurut **Haberlandt**, meristem apikal batang dibedakan atas **promeristem** yang merupakan beberapa lapis sel paling ujung yaitu berupa pemula apikal dan sel-sel turunannya yang masih bersifat embrional. Daerah meristematik di bawahnya, yang sel-selnya nanti mengalami diferensiasi terdiri dari tiga daerah meristem, yaitu: **protoderm** yang dalam perkembangannya membentuk epidermis; **prokambium** yang kelak membentuk jaringan pembuluh primer dan **meristem dasar** yang akan membentuk jaringan dasar tumbuhan seperti parenkim, kolenkim dan sklerenkim korteks batang.

**Hanstein** juga mengemukakan **teori histogen** tentang tiga daerah ujung pada Angiospermae. Daerah paling luar disebut **dermatogen**, paling dalam merupakan daerah sentral disebut **plerom** dan daerah diantara keduanya disebut **periblem**. Ketiga daerah tersebut bermula dari tiga kelompok pemula yang terpisah satu dengan yang lain dan langsung berperan sebagai histogen.

Dermatogen akan berkembang menjadi epidermis, periblem berkembang menjadi daerah korteks dan plerom akan berkembang menjadi silinder pusat atau stele. Dalam kenyataan, teori ini sulit diterapkan pada jaringan dewasa yang akan dirunut asalnya, terutama daerah periblem dan plerom sukar untuk dibedakan. Untuk terbentuknya ujung akar, teori ini lebih dapat diterima dan dirunut sesuai asal meristemnya.

Teori **tunika-korpus** dari **Schmidt** membedakan daerah meristem ujung hanya menjadi dua daerah berdasarkan bidang pembelahan sel-selnya (Esau, K., 1977). **Tunika** terdiri dari lapisan meristem ujung terluar yang bidang pembelahannya antiklinal. Lapisan tunika terdiri dari satu sampai beberapa lapis sel terluar, yang dalam perkembangannya membentuk epidermis dan sebagian korteks. **Korpus** merupakan lapisan sel-sel sebelah

dalam tunika yang pembelahannya terjadi ke semua arah, lapisan ini akan membentuk sebagian korteks dan stele dari organ, misalnya batang.

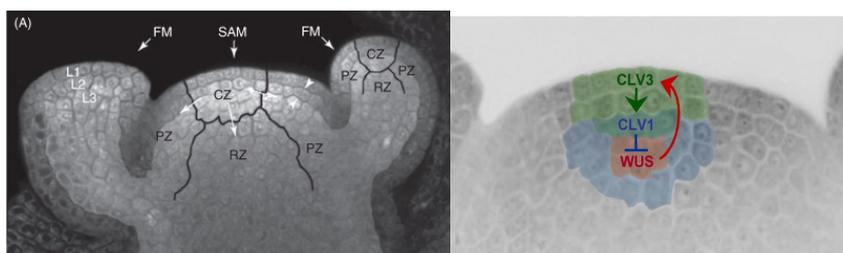
Pada bab ini uraian akan difokuskan pada fenomena aktifitas meristematik pada meristem pucuk (SAM) dan meristem akar (Root Meristem/RM), sebagai kelompok sel yang akan menentukan pola perkembangan dalam pembentukan organ tubuh tumbuhan.

## B. Struktur dan aktivitas Shoot Apikal Meristem

Selama fase perkembangan vegetatif, shoot apikal meristem (SAM) menghasilkan batang, daun dan kuncup aksilar dalam unit yang dikenal sebagai phytomer. Tiap phytomer terdiri dari daun (bisa lebih dari satu) yang melekat pada nodus batang, berasosiasi dengan kuncup aksiler di pangkal daun, dan meliputi satu internodus di bawahnya.

Analisis mikroskopis pada struktur dan aktivitas SAM dari beberapa tumbuhan yang berbeda, menunjukkan SAM terbagi menjadi beberapa daerah (Gambar 2.1 A). Daerah paling tengah di pucuk SAM disebut daerah tengah (central zone/ CZ), terdiri dari sel-sel inisial, yang merupakan pemula semua sel pada SAM. Sel-sel di daerah CZ ini membelah sangat lambat, mempertahankan ukuran CZ, serta membentuk daerah periferal (peripheral Zone/PZ). Sel-sel pada PZ meskipun merupakan derivat dari CZ, tampak sangat berbeda. Sel-sel pada PZ membelah dengan sangat cepat membentuk primordia organ yang akan berkembang menjadi daun. Di bagian bawah daerah CZ dan PZ terdapat daerah rusuk (rib zone/RZ) yang membelah untuk membentuk empulur batang. Pertumbuhan di bagian tersebut akan menekan dan mendorong sel-sel ke bawah dan ke luar.

Di daerah SAM juga dapat dikenali lapisan-lapisan sel. Lapisan sel pada SAM tanaman dikotil terdiri dari tiga lapis (L1, L2 dan L3) (Gambar 2B), sementara pada monokotil hanya



Gambar 2.1 Struktur SAM Arabidopsis

A. SAM terdiri dari daerah tengah (CZ), daerah feripheral (PZ) dan daerah rusuk (RZ). Pembelahan sel-sel di daerah CZ tersebut akan menekan sel-sel dari meristem mengarah ke bawah.

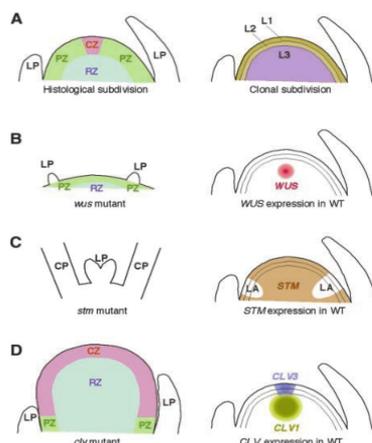
B. Diagram SAM menunjukkan tiga lapisan sel (L1, L2 dan L3) pada dikotil. Ekspresi dan interaksi protein (WUS, CLV1, CLV3, STM) berpengaruh pada pengendalian perkembangan meristem (Bowman & Eshed, 2000)

dua lapis (L1 dan L2). Sel-sel pada lapisan L1 dan L2 dikotil membelah secara antiklinal, yaitu dinding sel yang baru terbentuk tegak lurus terhadap permukaan. Sel-sel yang baru dihasilkan tersusun paralel terhadap permukaan. Secara bersama-sama sel-sel tersebut dikenal sebagai tunika. Hal yang berlawanan terjadi pada sel-sel lapisan L3 (yang disebut korpus), arah pembelahannya acak (berbagai arah bidang pembelahan), menghasilkan banyak lapisan sel dengan berbagai tipe sel pada organ dewasa.

Suatu eksperimen menunjukkan bahwa pada daun, sel-sel di lapisan L1 akan membentuk epidermis, sementara bagian lain dari daun dibentuk dari lapisan L2 dan L3 (monokotil hanya memiliki L2 saja)

### C. Pengendalian Meristem pada Shoot Apikal Meristem melalui Signaling

Shoot apikal meristem (SAM) adalah daerah penghasil sel yang akan membentuk organ-organ aerial setelah terjadinya perkecambahan. SAM terbentuk pertama kali pada fase embrio globular, dan berkembang menjadi berbentuk kubah pada embrio dewasa. Setelah perkecambahan SAM mulai mengendalikan program pembelahan sel dengan ketat untuk secara kontinue memasuki pertumbuhan vegetatif. Berdasarkan kajian histologi, SAM pada tumbuhan dewasa dibedakan menjadi tiga daerah, yaitu daerah tengah (central zone), daerah tepi (periferal zona) dan daerah rusuk (rip zone) (Gambar 2. 2A kiri). Central zone ini cukup kecil, terletak di bagian tengah posisi atas dari SAM. Sel-sel di daerah ini sangat lambat pembelahannya. Pembelahan di central zone ini akan menghasilkan sel-sel yang secara kontinue akan mengisi daerah tepi (periferal zone) dan daerah rusuk (rip zone). Sel-sel di daerah tepi (periferal zone) dan rusuk (rip zone) sangat mampat sitoplasmanya dan membelah sangat cepat. Selanjutnya sel-sel tersebut akan memasuki program pembelahan lanjut untuk membentuk organ-organ lateral dan batang.



Gambar 2. 2. Skema yang membedakan struktur SAM dan pola ekspresi dari gen regulator utama pada Arabidopsis Wild Type dan Mutan.

- Bagian daerah SAM didasarkan pada pengamatan histologi (kiri) dan didasarkan pada kelompok lapisan sel (kanan)
  - Struktur SAM pada mutan yang kehilangan fungsi *wus* (kiri) dan ekspresi gen *WUS* pada wild type (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998).
  - Struktur SAM pada mutan kehilangan fungsi *stm* (kiri) dan ekspresi gen *STM* pada wild Type (kanan) (Barton and Poethig, 1993; Endrizzi et al., 1996; Long et al., 1996). Bila dibandingkan dengan wild type, pada mutan *stm* jumlah sel di bagian SAM sangat tereduksi dan terbentuk diantara petiol (tangkai) kotiledon
  - Struktur SAM yang disebabkan kehilangan fungsi pada mutasi *CLV1*, *CLV2* atau *CLV3* (kiri) dan pola ekspresi gen *CLV1* dan *CLV3* (kanan) (Clark et al., 1993, 1995, 1997; Kayes and Clark, 1998; Fletcher et al., 1999).
- CP, cotyledon petiole; CZ, central zone; LA, leaf anlagen; LP, leaf primordium; L1, L2, and L3, epidermal, subepidermal, and underlying layers, respectively; PZ, peripheral zone; RZ, rib zone; WT, wild type.

Sel-sel pada SAM juga dapat dikelompokkan berdasarkan hubungan kelompoknya, yaitu epidermal, subepidermal dan lapisan dalam (Gambar 2. 2B kanan). Sel-sel pada lapisan epidermal dan subepidermal membelah secara antiklinal. Sel-sel ini akan menjadi bagian epidermal dan subepidermal semua organ lateral. Sel-sel di sebelah dalam lapisan tersebut arah pembelahannya lebih kompleks dan akan membentuk bagian dalam organ tumbuhan, seperti berkas pembuluh dan empulur.

Pembagian kelompok sel-sel pada SAM tersebut menunjukkan adanya koordinasi antar sel, yang juga menandakan adanya komunikasi interseluler yang mengendalikan program perkembangan membentuk organ dengan bentuk dan ukuran yang tetap.

### **C.1. Komponen Kunci Signaling**

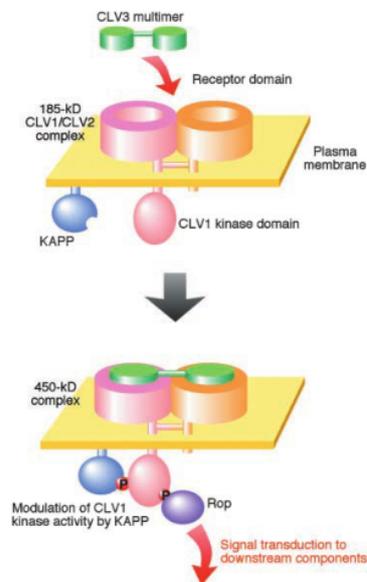
Fungsi utama SAM adalah memelihara keseimbangan jumlah sel inisial dan program diferensiasi sel-sel hasil pembelahannya. Pada Arabidopsis, populasi sel inisial tetap, bahkan setelah terjadi transisi perkembangan vegetatif ke generatif, yang memungkinkan SAM menghasilkan perbungaan dengan jumlah bunga yang tak terbatas. Pemeliharaan sel inisial dikendalikan oleh WUSCHEL (WUS), atau disebut faktor transkripsi homeodomain.

Mutan yang tidak memiliki wus mengalami cacat pada bagian SAM di semua tahap perkembangannya (Laux et al, 1996;. Mayer et al, 1998). Apeks pucuk vegetatif wus memiliki struktur datar dan sel-selnya kehilangan intensitas warna (bila diwarnai pada proses preparasi) yang dijumpai sebagai ciri khas SAM alami (Gambar 2. 2B kiri). Pembentukan primordia daun sangat lambat dan gagal untuk berkembang menjadi daun dewasa. Mutan tersebut akan menghasilkan kerusakan pada perbungaannya seperti halnya pada daunnya yang menggulung kusut. Dari hasil pengamatan tersebut dapat disimpulkan bahwa peran utama WUS adalah untuk menjaga stabilitas sel inisial (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). Analisis menunjukkan bahwa ekspresi mRNA WUS terletak pada beberapa sel di bagian bawah sel inisial (Gambar 2. 2B, kanan). Oleh karena itu, WUS mengontrol nasib sel inisial dengan cara pengendalian non-sel-otonom (Mayer et al., 1998).

Mutan shoot-meristemless (*stm*) (kehilangan sifat meristemnya ) menunjukkan adanya kerusakan (cacat) dalam pembentukan SAM atau pemeliharaan (kontinuitas selnya), serupa dengan *wus* (Barton dan Poethig, 1993; Clark et al, 1996;. Endrizzi et al, 1996). Tanaman dengan alel *stm* yang kuat, gagal untuk membangun SAM selama embriogenesis (Gambar 2.2 C, kiri). Primordia daun terbentuk antara petioles kotiledon yang

menyatu, tetapi mereka tidak berkembang menjadi daun roset. Diduga Gen STM mengkodekan faktor transkripsi yang terikat dengan domain DNA homeobox (Long et al., 1996). STM ditranskripsi di seluruh bagian SAM kecuali di daerah primordia daun baru (Gambar 2.2 C, kanan). Semua fitur ini menunjukkan bahwa fungsi utama dari STM adalah untuk menghambat sel memasuki program diferensiasi atau untuk meningkatkan proliferasi sel di tengah SAM (Endrizzi et al, 1996; Panjang et al, 1996).

Mutasi dalam tiga lokus CLAVATA (CLV1, CLV2, dan CLV3) menghasilkan fenotipe yang berlawanan dengan wus dan stm (Clark et al, 1993, 1995, Kayes dan Clark, 1998). SAM pada embrio mutan sedikit lebih besar dari embrio normal. Selama masa akhir pertumbuhan embryo, inisiasi organ terhambat, sedangkan SAM secara bertahap meningkat ukurannya karena bertambahnya sel-sel terdiferensiasi (Gambar 2. 2D, kiri). Fenotipe mutan ini menunjukkan peran gen CLV dalam membatasi ukuran populasi sel inisial. Ketiga gen CLV



telah diidentifikasi, dan produk protein mereka cenderung merupakan kompleks ligan-reseptor tunggal (Gambar 2. 3), konsisten pada tiga mutan yang memiliki fenotipe hampir identik di SAM (Clark et al, 1997; Fletcher et al, 1999, Jeong et al, 1999). Protein CLV1 adalah reseptor seperti kinase yang terdiri dari banyak Leusin yang berulang dan memiliki domain ekstraselular yang berfungsi sebagai reseptor dan domain Serin kinase sitoplasmik yang dihubungkan melalui domain transmembran (Clark et al., 1997). CLV2 secara struktural mirip dengan CLV1 tetapi tidak memiliki

Gambar 2. 3. Hipotesis mekanisme penghantaran (transduksi) signal oleh kompleks CLV.

CLV1 dan CLV2 berbentuk heterodimer 185 kD melalui ikatan tioester pada membran plasma. Ujung Nnya merupakan bagian yang kaya dengan Leu (LRR) yang mengarah ke bagian luar sel untuk membentuk domain reseptor, sementara domain kinase di ujung C terletak di dalam sitoplasma. Disini daerah LRR di tiap monomer CLV diasumsikan berbentuk silindris, didasarkan pada model tiga dimensi dari LRRs tumbuhan tertentu yang diketahui berbentuk kristal (Kajava, 1998). Ligan bebas CLV3 juga berbentuk multimer, meskipun secara alami molekulnya belum diketahui (pada skema ini diasumsikan strukturnya seperti homodimer). Ikatan antara ligan CLV3 dengan reseptor CLV1/CLV2, akan menyebabkan domain CLV1 terfosforilasi, kemungkinan karena kompleksitas CLV1/CLV2. Domain kinase yang terfosforilasi selanjutnya dikenali oleh beberapa molekul protein, termasuk Rho GTPase yang berikatan dengan protein (Rop) dan kinase yang berasosiasi dengan protein fosfatase (KAPP), sehingga terbentuklah kompleks 450-kD. Rop diperkirakan bekerja melalui mekanisme yang analog aliran aktivasi protein kinase yang diaktivasi oleh mitogen.

KAPP merupakan penambat di permukaan dalam membran plasma melalui keutuhan signal peptida.

domain kinase sitoplasma (Jeong et al., 1999). CLV3 berupa polipeptida kecil yang

mengkode urutan sinyal. Sementara itu, CLV3 tidak menunjukkan homologi dengan protein lain yang diketahui memiliki fungsi biokimia (Fletcher dkk., 1999).

Pada kedua kembang kol dan Arabidopsis, protein CLV1 terdapat pada dua kompleks dari 185 dan 450 kD (Trotochaud et al., 1999) (Gambar 2. 3). Bukti yang meyakinkan tapi tidak langsung menunjukkan bahwa kompleks protein 185-kD adalah heterodimer disulfida lingked antara CLV1 dan CLV2 (Trotochaud et al., 1999). Kompleks yang lebih besar (450-kD) termasuk kompleks 185-kD, adalah peptida CLV3, dan setidaknya memiliki dua ikatan kovalen yang menghubungkan sub unitnya, sebuah kinase yang berasosiasi dengan protein fosfatase (KAPP) dan Rho GTPase yang terikat pada protein (ROP) (Trotochaud et al, 1999, 2000). KAPP kemungkinan menjadi modulator aktivitas CLV1 kinase, sedangkan Rho dapat berpartisipasi dalam meneruskan transduksi sinyal yang jalurnya analog dengan pengaktifan nitrogen pada hewan oleh protein kinase cascade (Hirt, 1997; Williams et al, 1997; Batu et al, 1998, Trotochaud et al, 1999). Gabungan atau rakitan kompleks 450-kD memerlukan peptida CLV3, karena CLV1 ditemukan secara khusus pada kompleks 185-kD pada mutan *clv3* (Trotochaud et al., 1999). Selain itu, reseptor CLV1/CLV2 yang diekspresikan pada permukaan sel ragi menunjukkan telah berikatan dengan CLV3 dari ekstrak kembang kol (Trotochaud et al., 2000).

Semua pengamatan tersebut konsisten dengan model di mana peptida CLV3 mengikat dan mengaktifkan heterodimer 185-kD CLV1/CLV2 melalui autofosforilasi, yang kemudian menjadi sebuah kompleks 450-kD yang mencakup KAPP dan ROP (Gambar 3) (Trotochaud et al, 1999.). Pada kembang kol, 76% dari CLV3 ditemukan pada kompleks 450-kD, sedangkan sisanya 24% ditemukan dalam multimer 25-kD (Trotochaud et al, 2000.). Namun demikian tidak diketahui apakah pasangan CLV3 adalah multimer 25-kD atau apakah CLV3 mengikat ke reseptor CLV1/CLV2 sebagai multimer atau sebagai monomer.

CLV1 dan CLV3 diekspresikan pada daerah yang berbeda dari SAM (Gambar 2. 2D, kanan). Meskipun mRNA CLV3 khusus terakumulasi dalam sel inisial di daerah sentral (central zone), CLV1 diekspresikan juga di tangan daerah rusuk (riip zone). Daerah (domain) ekspresi CLV1 tumpang tindih, yang hanya sedikit mengekspresikan CLV3 (Clark et al, 1997;.. Fletcher et al, 1999). Hal ini konsisten dengan kemungkinan sekresi ekstraselular dari peptida CLV3 (Fletcher et al, 1999.). CLV3 kemungkinan disekresikan dari sel inisial dan mempengaruhi ekspresi CLV1 tepat di bawah sel inisial. CLV2 diekspresikan pada

sebagian besar organ dan mungkin memiliki peran tambahan dalam jalur signaling yang lain (Kayes dan Clark, 1998;. Jeong et al, 1999).

## C.2. Pemeliharaan Sel inisial SAM

Bagaimana gen pengatur berperan dalam memelihara (mempertahankan) SAM? Studi terbaru genetika molekuler telah mengungkapkan saling ketergantungan antara jalur WUS dan CLV (Merek et al, 2000;. Schoof et al, 2000.) (Gambar 2. 4A). Pertama, sinyal CLV mengendalikan ekspresi WUS. Hal tersebut didasarkan pada pengamatan bahwa (1) ukuran domain atau daerah yang mengekspresi WUS diperbesar pada mutan CLV (Schoof et al, 2000.), (2) ekspresi ektopik dari CLV3 meniadakan sel-sel yang mengekspresikan WUS, sehingga memunculkan fenotip seperti *wus* (Merek et al, 2000.). Kedua, karena ekspresi CLV3 khusus pada sel inisial, yang pemeliharaannya membutuhkan WUS, jalur CLV dapat diatur secara tidak langsung oleh WUS (Laux et al, 1996;. Mayer et al, 1998).

Berdasarkan hubungan tersebut, diusulkan suatu mekanisme yang melibatkan lingkaran (loop) self regulasi untuk pemeliharaan sel inisial (Gambar 2. 3A). Jika jumlah sel-sel inisial meningkat di daerah sentral (central zone), lebih banyak peptida CLV3 yang diproduksi, yang kemudian memberi sinyal pada sel di daerah rusuk (rip zone), agar mengekspresikan CLV1 untuk mengendalikan ekspresi WUS. Semakin sedikit sel yang mengekspresikan WUS, akan mengurangi jumlah sel inisial. Sebaliknya, jika sel inisial pada SAM terlalu sedikit, maka sinyal CLV3 akan dilemahkan, yang akan menyebabkan lebih banyak sel mengekspresikan WUS dan karenanya sel inisial bertambah (Schoof et al., 2000).

Gambar 2. 4. Model Pengendalian stem sel

- A. Kesenambungan sel inisial pada meristem vegetatif dan perbungaan (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). Ukuran populasi sel inisial dikontrol oleh lingkaran regulasi antara WUS dan CLV. Bila jumlah sel inisial meningkat, lebih banyak ligan CLV 3 dihasilkan dari sel inisial, yang akan diterima oleh reseptor kinase CLV2/CLV2 di lapisan bawahnya. Hasilnya adalah lebih sedikit sel-sel yang mengekspresikan WUS, sehingga melemahkan aktivitas peningkatan sel inisial (kiri). Berlawanan bila jumlah sel inisial menurun, ligan CLV3 yang dihasilkan berkurang. Konsekuensinya semakin banyak sel-sel yang mulai mengekspresikan WUS, sehingga merangsang atau meningkatkan pembentukan sel inisial (kanan).
- B. Terminasi populasi sel inisial pada FM (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001). Pada fase awal primordia bunga (tahap 2 kiri) diidentifikasi adanya gen LFY pada meristem yang diekspresikan ke seluruh primordia (Weigel et al., 1992), sementara WUS diekspresikan di daerah tengah (center) untuk mempertahankan populasi sel inisial untuk perkembangan lebih lanjut (Mayer et al., 1998). Selanjutnya pada tahap 3 (tengah), LFY dan WUS secara bersama-sama mengaktifkan ekspresi AG di daerah tengah primordia. Sebagaimana perkembangan proses perkembangan bunga (tahap 7 kanan), ekspresi WUS ditekan oleh AG. Ekspresi AG persisten di bagian tengah primordia dan menentukan organ bunga pada lingkaran ke 3 dan ke 4 (Drews et al., 1991).

Pada tanaman transgenik WUS, ekspresi WUS ekspresi dikendalikan dari lingkaran self regulasi (lingkaran pengaturan diri sendiri), dan menghasilkan fenotipe yang serupa dengan mutan yang kehilangan fungsi *clv*, meskipun mengekspresikan CLV3.

Baik WUS dan CLV dapat memberi signal yang melewati lapisan-lapisan sel. Untuk signal

CLV3 mungkin dilakukan melalui gerakan apoplastik dari peptida CLV3 (Fletcher dkk., 1999), tetapi mekanisme gerakan molekuler WUS yang bersifat sel non otonom belum diketahui. Demikian juga, tidak jelas bagaimana STM bertindak dalam kaitannya dengan jalur pengaturan WUS / CLV. Berdasarkan pola ekspresi pada SAM dewasa, STM muncul sebagai daerah cadangan yang terdiri dari sel yang tak terdiferensiasi dimana pola ekspresi WUS dan CLV ditentukan. Selama embriogenesis, ekspresi WUS dapat dideteksi sedini mungkin, saat embrio pada tahap 16-sel, ketika STM belum terekspresikan atau struktur SAM belum ditetapkan (Mayer et al., 1998).

### **C.3. Aktifitas Sel inisial**

Pada primordia bunga yang muda, sel inisial juga terdapat di apeks, disebut floral meristem (FM). Pada fenotip kedua mutan, pola ekspresi gen WUS dan CLV menunjukkan jalur pengendalian pada sel inisial FM. Bunga pada mutan *wus* terbentuk dengan jumlah normal pada bagian sepal dan petal, tetapi dua lingkaran terdalam bunga hanya menghasilkan satu lingkaran saja, yaitu stamen (Laux et al., 1996). Ini diakibatkan mutan *wus* tidak mampu menghasilkan jumlah sel inisial yang mencukupi untuk membentuk stamen dan karpel. Sebaliknya terjadi pada FM mutan *clv*, yang mengakumulasi sel inisial dan menghasilkan bunga dengan jumlah organ bunga berlipat, khususnya pada karpel (Clark et al., 1993, 1995; Kayes and Clark, 1998). Ekspresi WUS hanya pada sejumlah sel tertentu di daerah tengah FM, sementara CLV1 dan CLV3 diekspresikan di daerah senter dan apeks FM. Ekspresi tersebut sama dengan pada SAM.

Pada FM tipe liar, kemampuan sel inisial untuk mempertahankan jumlah populasi sel yang konstan akan berakhir saat perkembangan bunga, karena daerah sentral FM diprogram membentuk jumlah karpel yang terbatas. *AGAMOUS* (AG) adalah gen yang terlibat dengan proses tersebut, diperkuat munculnya organ bunga yang cacat pada mutan *ag*, terbentuk organ bunga yang tak terbatas (Bowman et al., 1989). Fenomena tersebut menunjukkan peran WUS, sebab bunga dengan mutan ganda *ag* dan *wus*, menunjukkan cacat yang serupa dengan mutan tunggal *wus* (Laux et al., 1996).

Diketahui peran AG dibawah regulasi WUS. Pada FM normal, ekspresi keduanya (WUS & CLV3) berkurang saat perkembangan bunga dan menghilang saat inisiasi primordia karpel. Pada FM mutan *ag*, ekspresi keduanya (WUS dan CLV) tetap terlihat untuk waktu yang lama setelah perkembangan organ bunga lengkap (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001). Represi atau penekanan WUS oleh AG tampaknya sesuatu yang independen, bukan

karena signal dari CLV, karena pada FM mutan ganda *ag clv1*, ekspresi WUS tidak berlangsung lama, tetapi tampak diperluas daerahnya (Lohmann et al., 2001). Berlawanan dengan ekspresi ektopik WUS di beberapa titik dari FM menghasikan pembentukan organ yang tak terbatas di daerah terbentuknya bunga (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001). Semua pengamatan tersebut menunjukkan bahwa diperlukan AG untuk menekan regulasi WUS dan karena itu akan menentukan terminasi pemeliharaan (keberlanjutan) sel inisial.

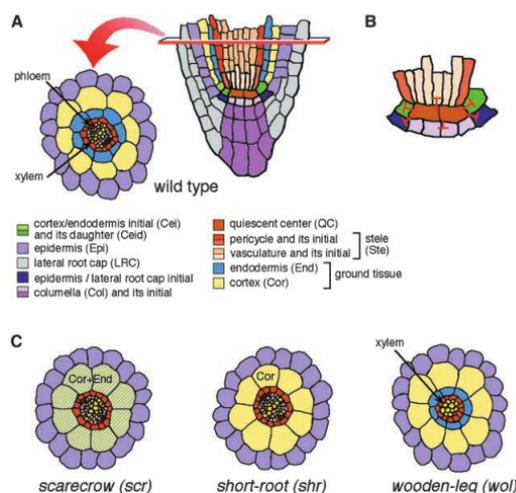
Ada bukti yang kuat bahwa ekspresi AG tergantung pada WUS dan pada meristem bunga diketahui adanya gen LEAFY (LFY) (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001). Ekspresi ektopik WUS mengakibatkan transkripsi  $\beta$ -glucuronidase (GUS) yang dikendalikan oleh daerah regulasi AG cis. Hal tersebut sama dengan kemampuan WUS ektopik untuk membentuk populasi sel inisial yang meluas, seperti ditunjukkan oleh jumlah stamen dan karpel yang tak terbatas. Ekspresi GUS dan pembentukan organ yang tak terbatas, keduanya tidak dijumpai pada eksperimen yang menggunakan mutan *lfy*. Interaksi dari WUS/LFY dan AG telah diteliti lebih jauh secara molekuler. Baik studi *in vitro* maupun *in vivo* menunjukkan ikatan langsung antara LFY dan WUS dengan elemen cis pada intron kedua AG (Busch et al., 1999; Lohmann et al., 2001). Analisis kualitatif menggunakan sistem ekspresi ragi (yeast) menunjukkan bahwa WUS dan LFY bekerja sinergis untuk mengaktifkan ekspresi AG, bahkan secara kooperatif terkait dengan dua protein yang tidak dapat diamati secara *in vitro* (Lohmann et al., 2001). Berdasarkan observasi tersebut, diusulkan jalur signaling untuk terminasi sel inisial (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001) (Figure 4B). Pada primordia bunga yang muda, jalur signaling WUS/CLV menjaga kontinuitas populasi sel inisial di apek. Selanjutnya WUS mengaktifkan transkripsi AG yang terikat secara langsung dengan promotor AG. Transkripsi AG oleh WUS akan ditingkatkan sinerginya oleh LFY, yang hanya diekspresikan pada primordia bunga, tetapi tidak pada SAM. Karena ekspresi WUS terbatas pada sejumlah sel-sel di FM, maka ekspresi AG hanya di daerah tengah dari primordia bunga, tempat khusus akan terbentuknya stamen dan karpel. Pada tahap perkembangan bunga selanjutnya, AG akan mengendalikan ekspresi WUS, dengan demikian akan mengakhiri (terminasi) populasi sel inisial. Dengan demikian, WUS dan AG merupakan umpan balik negatif di mana WUS mengaktifkan transkripsi AG, yang pada gilirannya merepresi (menekan) ekspresi WUS. Lingkaran signaling tersebut serupa dengan lingkaran regulasi WUS/CLV pada SAM. Perbedaan penting pada jalur WUS/AG tidak melibatkan

komunikasi sel ke sel. Namun demikian satu hal yang harus diingat, bahwa jalur WUS/AG mengikuti suatu pola, sama halnya dengan jalur WUS/CLV. Perbedaan yang mencolok pada jalur WUS/CLV secara kontinue berperan pada seluruh perkembangan tumbuhan, sementara jalur WUS/AG tampaknya hanya berfungsi sekali pada satu FM.

#### D. Signaling di bawah tanah: Pembelahan dan Diferensiasi Akar

Dibandingkan dengan SAM, meristem akar (RM) terdiri dari lebih sedikit sel dan strukturnya sederhana. Pada Arabidopsis, pola pembelahan sel pada RM telah tuntas dikarakterisasi, dan pemetaan nasib tiap-tiap selnya dapat dikatakan lengkap (Dolan et al., 1993). Akar Arabidopsis tua secara konsentris terdiri dari beberapa lapis sel, dari dalam ke luar terdiri dari berkas pembuluh, pericikel, endodermis, korteks dan epidermis (Gambar 5A). Berkas pembuluh dan perisikel secara bersama di sebut stele.

Sel-sel di tiap lapisan tersebut memiliki asal atau inisial sel yang terletak pada RM, dan membelah secara berurutan dan berulang-ulang. Satu dari dua sel anak yang dihasilkan akan tetap berperan sebagai sel inisial, sementara yang satu akan masuk ke jalur program diferensiasi. Sel dari beberapa bagian akar berasal dari beberapa kelompok sel yang sama, sebagai contoh, epidermis dan tudung akar lateral berasal dari sel-sel inisial yang sama, dan dua lapisan jaringan dasar, yaitu endodermis dan korteks juga berasal dari sel inisial yang sama (Gambar 2. 5A).



Gambar 2. 5. Skema struktur akar Arabidopsis wild-type dan mutan

- (A) Akar Wild-type (Dolan et al., 1993). Tipe-tipe sel menjadi kunci acuan utama. Gambar singkat tersebut digunakan untuk acuan semua gambar berikutnya.
- (B) Sel-sel QC berfungsi sebagai pusat pengaturan RM dengan menghambat diferensiasi sel-sel disekitarnya (sel inisial) (van den Berg et al., 1997; Umeda et al., 2000).
- (C) Pola kelainan struktur radial akar pada mutan Arabidopsis, *scr*, *shr* dan *wol* (Benfey et al., 1993; Di Lorenzo et al., 1996; Helariutta et al., 2000; Mähönen et al., 2000).

#### D.1. Signaling Interseleuler pada Perkembangan Akar.

Pembelahan sel yang sangat terkoordinasi adalah akibat komunikasi sel ke sel yang sangat intens. Kajian pertama menggunakan teknik pembuangan dengan laser ditemukan bukti yang kuat terkait pentingnya jalur signaling pada pola pembentukan akar (van den Berg et al., 1995). Jika sel inisial kortek/endodermis dibuang, sel perisikel akan mengarah ke posisi sel yang dibuang dan melakukan pembelahan periklinal. Sel hasil pembelahan di sebelah luar selanjutnya akan menjadi sel inisial korteks/endodermis, yang selanjutnya akan membelah melintang. Sel anak di bagian atas selanjutnya membelah periklinal, menghasilkan sel pertama di deretan korteks dan endodermis. Perisikel tersebut menurunkan sel-sel endodermal yang berdiferensiasi menjadi endodermis, dengan terbentuknya pita kaspari. Fenomena tersebut juga terjadi bila sel inisial epidermis/tudung akar lateral dibuang (van den Berg et al., 1995).

Spesifikasi ulang nasib sel tidak terbatas pada mekanisme pematian sel, tetapi juga terjadi secara alami. Analisis akar setelah diberi perlakuan stres panas menunjukkan bahwa sel-sel pada turunan korteks/endodermis menempati epidermis di bagian luar dan lapisan stele di bagian dalam. Sangat mengejutkan bahwa pola akar secara radial tetap normal, tidak menampakkan peningkatan atau pengurangan jumlah lapisan sel atau pada jumlah sel di tiap lapisan. Namun demikian perlakuan stres panas dapat meningkatkan frekuensi kematian sel, pengamatan ini menunjukkan bahwa pola radial akar tidak kacau, bahkan saat sel-sel pada daerah meristem hilang atau rusak. Jelaslah bahwa signaling interselular adalah kunci untuk mempertahankan kontinuitas RM.

## **D.2. Pemeliharaan sel inisial pada RM**

Sel-sel inisial akar secara fungsional sama dengan CLV3 yang terekspresi pada sel inisial pada SAM. Sel-sel inisial tersusun melingkari beberapa sel yang tidak aktif bermitosis di daerah tengah RM, yang disebut "quiescent center" (QC) atau daerah tenang. Daerah tenang berperan penting dalam pemeliharaan aktivitas RM. Bila sel QS dihilangkan dengan laser, maka sel-sel inisial kehilangan kemampuannya untuk membentuk sel inisial dan akan mulai berdiferensiasi atau membelah menjadi sel-sel anak dengan beberapa karakteristik (van den Berg et al., 1997). Fenomena tersebut juga dijumpai pada mutan yang kehilangan aktivitas pembelahan sel pada fase postembrionik, dan diketahui bahwa fungsi QC adalah pembelahan sel secara independen (van den Berg et al., 1997). Pengamatan tersebut

menandakan bahwa pemeliharaan QC ditentukan oleh sel-sel inisial disekitarnya melalui penghambatan diferensiasinya (Gambar 2. 5B).

Kesimpulan yang sama juga digambarkan dari kajian diferensiasi sel-sel akar yang ditingkatkan secara genetik melalui modulasi level ekspresi dari CAK, sebuah cyclin-dependent-kinase yang mengaktifkan kinase (Umeda et al., 2000). Kemampuan QC untuk menghambat pembelahan sel-sel inisial serupa dengan fungsi sel-sel yang mengekspresikan WUS pada SAM. Perbedaan utama adalah sel-sel yang mengekspresikan WUS tampak secara kontinu selalu dibentuk, sementara sel-sel QC dipelihara untuk waktu yang lebih panjang.

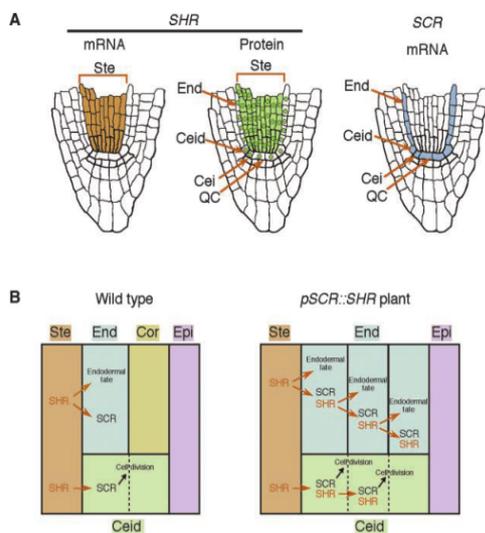
### **D.3. Signaling Radial pada Penentuan Pola Jaringan Dasar**

Pola radial lapisan-lapisan sel yang tampak pada akar dewasa telah diawali penentuannya sejak awal perkembangan embrio. Melalui eksperimen diketahui bahwa pembentukan pola radial yang tepat dihasilkan dari jalur informasi posisional yang top-down dari sel-sel dewasa menuju sel-sel inisial. Pertama, pada mutan dengan kerusakan pola radial memiliki kerusakan yang analog dengan kerusakan pada embrio dan akar dewasa (Scheres et al., 1995). Kedua, bila komunikasi interseluler antara sel-sel inisial korteks/endodermis dengan sel-sel yang lebih dewasa di atasnya yang telah rusak akibat terpapar laser, dengan tepat sel inisial berhenti membelah (van den Berg et al., 1995).

Mutan *scr* dan *shr*, adalah mutan yang kehilangan kemampuan membelah asimetris pada sel-sel inisial korteks/endodermis, sehingga menghasilkan satu lapisan jaringan di tempat yang secara normal harusnya terdiri dari dua lapis, yaitu korteks dan endodermis (Figure 5C) (Benfey et al., 1993; Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000).

Dua mutan tersebut berbeda pada satu lapisan, *scr* bercirikan terjadi diferensiasi korteks dan endodermis, sementara pada *shr*, hanya terjadi karakterisasi korteks saja (Figure 5C). Sementara itu *SCR* diperlukan untuk ketepatan pembelahan sel inisial korteks/endodermis, sementara itu *SHR* diperlukan baik untuk pembelahan kedua sel dan spesifikasi pemetaan nasib sel endodermal. *SCR* dan *SHR* kemungkinan dikode oleh faktor transkripsi yang dimiliki oleh tanaman serupa kelompok rumput-rumputan (Di Laurenzio et al., 1996; Pysh et al., 1999; Helariutta et al., 2000). Meskipun gen *SHR* dan *SCR* ditranskripsikan satu sama lain saling sendiri (terpisah), tetapi pada lapisan yang berdekatan

di root (Gambar 6A). Scr ditranskripsi di dalam endodermis, juga pada QC, inisial korteks/endodermis, dan sel-sel anaknya (Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000). Berbeda dengan SHR yang ditranskripsi di stele, termasuk inisial stele dan perisikel (Helariutta et al., 2000). Pola ekspresi tersebut menunjukkan mekanisme sel non autonom dari SHR melalui dua proses. Yang pertama SHR mengendalikan diferensiasi endodermis, dimana disitu SHR tidak ditranskripsi. Kedua SHR diperlukan untuk ketepatan pembelahan sel-sel turunan inisial korteks/endodermis, dimana SHR juga tidak ditranskripsi di situ. Meskipun sasaran SHR untuk endodermal secara spesifik tidak diketahui, ada bukti kuat bahwa SHR bertindak melalui SCR untuk mempengaruhi pembelahan sel-sel anak dari inisial korteks/endodermis. (Helariutta et al, 2000;. Nakajima et al., 2001).



Gambar 2. 6. Pola Radial Jaringan dasar Akar

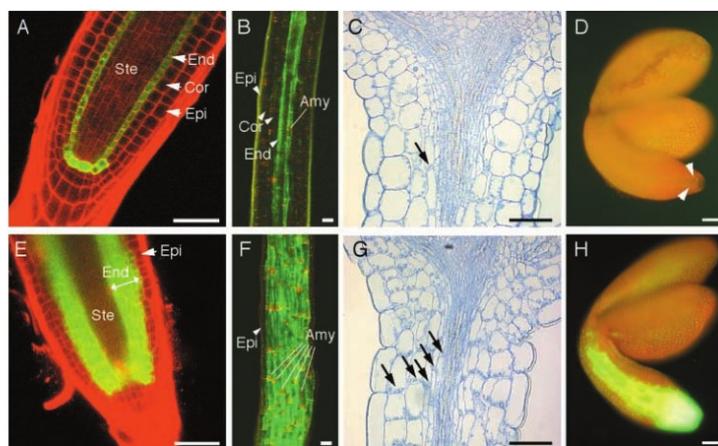
(A) Letak mRNA SHR (kiri), protein SHR (tengah), dan mRNA SCR (kanan) pada RM (Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000; Wysocka-Diller et al., 2000; Nakajima et al., 2001).  
 (B) Mekanisme interseluler signaling pada pembentukan wild-type (kiri) dan tanaman transgenik pSCR::SHR (kanan) (Nakajima et al., 2001). Pada akar wild-type (kiri), protein SHR dihasilkan pada stele dan tampak bergerak pada selaput sel didekatnya melalui plasmodesmata (panah merah). Pada lapisan yang berdekatan, SHR mengaktifkan transkripsi SCR yang penting untuk terjadinya pembelahan sel asimetris pada sel-sel turunan inisial korteks/endodermis. Dengan demikian akan dihasilkan pemisahan lapisan korteks dan endodermis. Di bagian yang lebih dewasa, SHR akan menentukan nasib sel didekatnya menjadi sel-sel endodermal. Protein SHR bergerak terbatas pada jarak satu sel melalui mekanisme yang belum diketahui. Pada tanaman transgenik pSCR::SHR (kanan), signaling SHR interseluler diperkuat berulang kali dengan dihasilkannya protein SHR. Hasil ini menunjukkan dihasilkannya lapisan cadangan karena pengulangan pembelahan yang dimediasi SCR dan tambahan pemetaan sel-sel endodermal pada lapisan tersebut. Secara singkat untuk tipe sel dapat dilihat pada Gambar 5A.

Mekanisme aktivitas atau tindakan sel non autonom SHR tergantung pada pergerakan protein interseluler (Nakajima et al., 2001). Ekspresi SHR, gabungan protein green fluorescent protein (GFP) pada mutan shr dikendalikan oleh promotor SHR yang secara keseluruhan memetakan sistem radial akar, hal tersebut menunjukkan bahwa gabungan protein tersebut berfungsi dengan baik. Pada akar transgenik, GFP fluoresence jelas terlokalisasi pada inti endodermis, QC dan inisial korteks/endodermis beserta turunannya, dan juga pada inti serta sitoplasma sel-sel stele (gambar 5A). Perbedaan lokalisasi atau letak mRNA dan protein dimodelkan pada pergerakan mandiri transmisi informasi posisi SHR dari stele ke satu lapisan luar (Gambar 5B, left) (Nakajima et al., 2001). Karena tampaknya SCR berfungsi pada sel-sel yang sama, dimana gen-gen tersebut ditranskripsi, maka tidak

menunjukkan pergerakan interseluler sebagai fitur umum protein GRAS. SHR diperkirakan sebagai faktor transkripsi dan letaknya pada inti sel di lapisan yang berdekatan, dan ada kemungkinan bahwa SHR terlibat langsung dalam pengendalian transkripsional gen efektor di bawahnya.

Meskipun target transkripsi langsung untuk SHR belum diidentifikasi, namun diduga targetnya adalah SCR. Karena ekspresi SCR sangat tereduksi pada mutan *shr*, sehingga transkripsi tersebut secara langsung atau tidak harus dikendalikan oleh SHR. Satu lapisan terluar yang menampakkan protein SHR, secara tepat juga merupakan sel yang mentranskripsi SCR (Gambar 6A). Konsisten dengan temuan tersebut, tanaman transgenik mengekspresikan SHR dibawah kendali SCR (*pSCR::SHR* plants), mengalami proliferasi yang tak terbatas pada lapisan endodermis yang mentranskrip SCR (bandingkan Gambar 2. 7A and 1. 7E) (Nakajima et al., 2001).

Berdasarkan hal tersebut, tampaknya ada penguatan sinyal autocatalytic, di mana SHR mengaktifkan promotor SCR di lapisan yang berdekatan, yang kemudian menghasilkan protein SHR dari *pSCR :: SHR* transgenik (Gambar 6B, kanan). Gerakan protein SHR tidak terbatas pada endodermis tetapi juga diarahkan ke QC (Nakajima et al., 2001). Konsisten dengan temuan ini, *pSCR ::* transgenik akar SHR memiliki lapisan cadangan QC, menunjukkan bahwa, tergantung pada posisi, SHR menentukan tidak hanya endodermis tetapi juga nasib sel QC (Nakajima et al., 2001).



Gambar 2. 7. Perbandingan antara wild-type dengan tanaman transgenik *pSCR::SHR* (A) sampai (D) Wild type.

(E) sampai (H) tanaman transgenik *pSCR::SHR*

(A) and (E) Gambar akar. Merah menunjukkan propidium iodide yang mewarnai dinding sel. Hijau menunjukkan fluoresensi GFP fluorescence pada tempat transkripsi SCR.

(B) and (F) Gambar hipokotil yang tumbuh di bawah cahaya. Merah menunjukkan autofluoresensi plastida. Hijau menunjukkan GFP fluorescence pada tempat transkripsi SCR.

(C) and (G) Sayatan membujur hipokotil yang tumbuh di bawah cahaya. Tanda panah menunjukkan endapan amiloplas yang mengarah ke arah gravitasi. Endapan amiloplas terjadi khusus dalam endodermis tanaman wild type (tanda panah pada C), tetapi endapan tersebut ditemukan di semua lapisan antara stele dan epidermis tumbuhan transgenik (tanda panah pada G)

(D) and (H) Gambar epifluoresensi embrio tahap dewasa. Warna hijau tampak pada tempat transkripsi SCR. Pada embrio wild-type, GFP fluoresensi sedikit tampak di atas warna merah autofluoresensi (tanpa panah pada D), tetapi GFP fluorescence yang kuat ditemukan pada embriomtransgenik (H)